

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

2 Off nl gungsschrift  
10 DE 196 18 032 A 1

21 Aktenzeichen: 196 18 032.5  
22 Anmeldetag: 4. 5. 96  
23 Offenlegungstag: 13. 11. 97

51 Int. Cl.<sup>8</sup>:  
G01 N 1/28  
G 01 N 27/62  
G 01 N 33/53  
H 01 J 49/10

DE 196 18 032 A 1

71 Anmelder:  
Bruker-Franzen Analytik GmbH, 28359 Bremen, DE

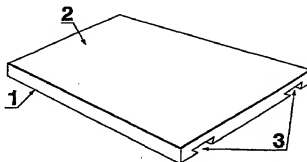
72 Erfinder:  
Käster, Claus, 28865 Lilienthal, DE; Franzen, Jochen,  
28359 Bremen, DE; Suckau, Detlev, 28879 Grasberg,  
DE

56 Entgegenhaltungen:  
DE 41 43 071 C2  
GB 22 35 529 A  
GB 22 35 528 A  
EP 00 34 318 A2

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Lagerfähig vorpräparierte MALDI-Proben-träger

57 Die Erfindung betrifft vorpräparierte Proben-träger für die matrixunterstützte Ionisierende Laserdesorption großer Analytmoleküle (MALDI) zur Erzeugung von Ionen der Analytsubstanz für deren massenspektrometrische Untersuchung, und Verfahren für die Präparation der Proben-träger. Die Erfindung besteht darin, die mit einer Matrixsubstanz für die Unterstützung der Desorption fertig präparierten Proben-träger dadurch versand- und lagerfähig zu machen, daß die Matrixsubstanz aus mindestens zwei verschiedenartigen Komponenten gebildet wird, wobei eine lackartige Komponente weitere Substanzen, die während der Laserdesorption für die Ionisierung der Analytmoleküle sorgen, vor Oxidation, Hydrolyse und anderen Arten der Zersetzung schützt. Die lackartige Komponente adsorbiert auch die Analytmoleküle an der Oberfläche und unterstützt die Desorption bei Laserbeschuß. Besonders geeignet ist eine dünne Schicht aus Nitrozellulose (korrekter: Zellulosenitrat), in der die zur Ionisierung der Analytmoleküle notwendigen Substanzen eingebettet werden. Die in Wasser unlösliche Lackschicht adsorbiert die großen Analytmoleküle aus Lösung an ihrer Oberfläche. Die vorpräparierte Schicht kann auch weitere Komponenten zur gezielten Veränderung der Analytmoleküle enthalten, beispielsweise Enzyme zur gezielten Verdeuung von Proteinen. Auch Komponenten für das selektive Binden von Analytmolekülen können vorhanden sein, etwa Antikörper zum Festhalten spezifischer Proteine.



DE 196 18 032 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen  
BUNDESDRUCKEREI 09. 97 702 046/183

8/25



in charakteristischer Weise so in Bruchstücke zerlegt werden, daß über eine Messung der Molekulargewichte dieser Bruchstücke eine sofortige Identifizierung des aufgetragenen Proteins anhand von Protein-Datenbanken möglich wird. Krankhafte Veränderungen eines solchen Proteins können ebenfalls durch einen solchen Verdau mit anschließender Messung der Molekulargewichte der Bruchstücke festgestellt werden, wobei es sogar möglich ist, das veränderte Teilstück der Proteinkette zu erkennen.

Die dazu notwendigen Enzyme sind relativ stabil. Sie können einer vorpräparierten Matrixschicht beigegeben werden, wenn diese haltbar vorpräpariert werden könnte, und wenn die Enzyme nicht in direkter Berührung zu den meist sauren Ionisierungs- und Lagerungsmitteln sein könnten. Da es jedoch keine Lagerungsmittel gibt, verlangt auch diese Methode jeweils frischen Ansatz. Sie ist damit sehr aufwendig.

Es ist die vordringliche Aufgabe der Erfindung, das Verfahren zur Präparation von MALDI-Schichten und MALDI-Verfahren der Ionisierung von Analytmolekülen selbst so abzuwandeln, daß eine Vorpräparation der Probenträger erfolgen kann, und zwar so, daß die Probenträger über längere Zeit ohne Funktionsverlust gelagert werden können. Die vorpräparierten Probenträger sollen es ermöglichen, die Analytmoleküle in betragsmäßig ausreichender Menge aufzutragen, beispielsweise in der Form einer Pulverschicht, die auf der Probenträgeroberfläche aufgetragen werden, um Restbestandteile zu entfernen. Es ist es ein Puffersubstanzen oder Salzen zu entfernen. Es ist es ein Puffersubstanzen oder Salzen zu entfernen. Es ist es ein Puffersubstanzen oder Salzen zu entfernen.

Eine weitergehende Aufgabe der Erfindung soll es sein, auch Vorpräparationen unter Einschluss anderer Reaktionspartner zu ermöglichen, beispielsweise mit Enzymen zum charakteristischen Verdau von Proteinen, Enzymen zum charakteristischen Verdau von Proteinen, Enzymen zum charakteristischen Verdau von Proteinen.

Die Erfindung soll ein MALDI-Verfahren mit hoher Ionenausbeute und hoher Empfindlichkeit liefern, um ionenempfindliche Proben von nur wenigen Femtomol arbeiten zu können. Sie soll darüber hinaus durch eine gleichmäßige Schicht automatisch ablaufende MALDI-Prozesse ermöglichen.

Es ist der Grundgedanke der Erfindung, das Aufgabenspektrum, das die Matrixsubstanz zu erfüllen hat, auf zwei oder mehr Substanzkomponenten aufzuteilen, und dabei einer Substanzkomponente die zusätzliche Aufgabe des Schutzes der anderen Substanzkomponenten zuzuweisen. Dabei liegt der Erfindung die experimentell gewonnene Erkenntnis zugrunde, daß für einen erfolgreichen MALDI-Prozess die Analytmoleküle und die Matrixkomponenten in Berührung sein müssen. Die Substanzkomponente in festen Zustand, im idealen Fall der Einbau der Analytmoleküle in die Mikrostrukturen der Matrixsubstanz, war bisher das Ziel aller Präparationsverfahren.

Eine Aufteilung des Aufgabenkatalogs auf zwei Substanzkomponenten kann nach diesem Grundgedanken der Erfindung etwa so aussehen:

- (a) eine erste Matrixsubstanz (ein "Binder") übernimmt die adsorptive Bindung der Analytmoleküle an einer vorzugsweise glatten Oberfläche, sie übernimmt die Bindung an die Unterlage, sie kann vorzugsweise die Energieabsorption übernehmen, sie übernimmt insbesondere die Bildung der Plasmaplasma- und sie übernimmt zusätzlich nach dem Grundgedanken dieser Erfindung den Schutz der ionisierenden Matrixkomponente;
- (b) mindestens eine weitere Matrixsubstanz (ein "Ionisierer"), die vorzugsweise molekular in der Substanz gelöst ist, übernimmt die Ionisierung der Analytmoleküle in der Plasmaplasma; sie kann der Substanzkomponente die Energieabsorption übernehmen, wenn diese nicht von der ersten oder von weiteren Matrixsubstanzen übernommen wird.

Der Schutz der ionisierenden Matrixkomponente kann am besten verwirklicht werden, wenn der (oder die) Ionisierer ganz in einer luft- und wasserdichten Masse des Binders eingeschlossen werden kann. Es ist daher ein weitergehender Gedanke der Erfindung, einen lackartig verarbeitbaren Binder zu verwenden, der den Ionisierer in molekularer Lösung in die Lackmasse aufnehmen kann.

Es ist nun für den MALDI-Prozess notwendig, daß der Binder die Moleküle des Ionisierers bei der Desorption freisetzt. Das kann beispielsweise durch vollständige Verdampfung geschehen. Da aber lackartige Schichten in der Regel aus polymeren Molekülen aufgebaut sind, ist eine solche vollständige Verdampfung nicht ohne weiteres möglich. Es ist daher ein weiterer Gedanke der Erfindung, daß der Binder die Freigabe der Moleküle des Ionisierers am besten erfüllen kann, wenn er sich bei Laserlichtbeschuss in kleine Moleküle zersetzt. Als besonders vorteilhaft bieten sich hier polymere Sprengstoffe an, die sich bei Erhitzung durch den Laserstrahl in kleine Moleküle Wasser, Kohlenmonoxid, Kohlendioxid, Stickstoff und Wasserstoff zersetzen. Es muß aber nicht unbedingt ein solch starker Zersetzungsprozess sein, sondern es genügt, wenn die Zersetzungsvorgänge, deren Energiezufuhr aus der Laserstrahlung stammt, können hier eingesetzt werden.

Der Binder muß aber auch die Aufgabe der adsorptiven Bindung der Analytmoleküle übernehmen können, da die ungeschlossenen Moleküle des Ionisierers diese Aufgabe nicht übernehmen können. Es ist nun ein weiterer Gedanke der Erfindung, hier hochadsorptive Polymerstrukturen zu benutzen, wie sie etwa aus Adsorptionsstrukturen zur Reinigung von hochmolekularen organischen Substanzen oder von Blotmembranen zum Blotting 2D-elektrophoretischer Trennung bekannt sind.

Ein hervorragende Kombination einer hochadsorptiven Substanz mit erwünschtem Sprengstoff-Charakter ist die Nitrozellulose (korrekter: Zellulosenitrat, Kurzeichen nach DIN: CN), deren Explosivität sich darüber hinaus durch den Grad der Nitrierung einstellen läßt. Man spricht bei Stickstoffgehalten zwischen 10,5 und 12,5% von Zellulosenitrat (Colloidiumnitrat), bei solchen zwischen 12,5 und 14,1% von Zellulosenitrat (Schießbaumwolle). Beide Sorten verpulvern bei Erhitzung, die Verpuffungsprodukte bestehen aus etwa 100 bis 3500 teil- bis vollnitrierten Glukose-Einheiten.

Der Binder kann, muß aber nicht notwendig die Aufgabe der Lichtabsorption übernehmen. Diese Aufgabe

5 kann durch eine Derivatisierung des Zellulosenitrats geklärt werden, wobei absorptive Molekülgruppen in das Zellulosegerüst eingebaut werden. Durch Wahl der Molekülgruppen kann man sich an die Wellenlänge des verwendeten Lasers anpassen. — Es ist aber auch möglich, diese Aufgabe einer dritten Matrixsubstanz zu übertragen. Zellulosenitrat ist hervorragend färbbar, und kann somit für beliebige Wellenlängen undurchsichtig gemacht werden.

Das Zellulosenitrat kann sehr einfach in Azeton gelöst werden, wobei die Automatisierbarkeit der Druck- und Sprühverfahren, sowohl durch Sprühen, Streichen oder Drucken, als auch durch die Genuaigkeit der Massenbestimmung ist auch für die Zellulosenitrat-Verfahren technisch so notwendig. Aus Zellulose hergestellte Nitrolacke verwenden den meist das weniger nitratierte Zellulosedinitrat als Grundstoff. Erst die Nitrurierung der Zellulose ermöglicht die Lösung des entstehenden Produkts in organischen Lösemitteln.

Die Zellulosegrundstruktur ist besonders günstig für die oberflächliche Bindung der Analytmoleküle wegen ihrer besonders starken Adsorptivität. Da Nitrozellulose nicht in Wasser löslich ist, kann man Proteine, wasserlösliche Polymere und andere großmolekulare Analytsubstanzen sehr einfach aus wässriger Lösung auf die Lackschicht aufbringen. Nitrozellulose wird häufig für Blotmembranen verwendet; sie hat gegenüber anderen, meist teureren Blotmembranen den Nachteil, daß die Analytmoleküle sehr fest, für viele Untersuchungsverfahren zu fest, an der Oberfläche haften. Dieser Nachteil ist im vorliegenden Fall ein Vorteil. Die wässrige Lösung von hochmolekularen Analytsubstanzen wie Proteinen enthält neben den Analytmolekülen häufig noch stabilisierende Puffersalze und andere für den Ionisationsprozeß schädliche Bestandteile. Die feste Haftung der Analytmoleküle und die Wasserunlöslichkeit der Nitrozellulose ermöglicht ein leichtes und verlustarmes Waschen der aufgetragenen großmolekularen Analytsubstanzen.

Sprengstoffe mit ihrer exothermen Zersetzung führen auch gleichzeitig zu einer sehr konstanten Wolkendichte, dadurch ergeben sich für die Flugzeit-Massenspektrometrie günstige Voraussetzungen für eine hohe Massengenauigkeit. Kleinere Energieunterschiede im Laserlichtstrahl spielen eine untergeordnete Rolle. Der Sprengstoff wird dabei so dünn aufgetragen (teilweise nur Bruchteile eines Mikrometers), daß ein selbständiges Nachbrennen in Nachbarräumen unterbleibt, da das Nachbrennen in Nachbarräumen die Verbrennung der Probenstränge stark kühlt und die Verbrennung löst. Im Gegensatz zu normalem MALDI, bei dem ein Laserlichtfokussierungsdurchmesser von 100 bis 200 Mikrometern bevorzugt, um großflächig eine dünne Schicht der Matrixoberfläche abzutragen, kann man bei Sprengstoff-MALDI mit Fokussierungsdurchmessern von 5 bis 20 Mikrometern arbeiten. Es wird dabei innerhalb dieser Durchmesser die gesamte Schicht bis auf den Probenstrang darunter abgetragen.

Das Aufbringen der Analytmoleküle auf die Oberfläche der Lackschicht hat den weiteren Vorteil, daß die so gebildeten Ionen der Analytmoleküle nach Ausdehnung der Wolke eine weit geringere Streuung ihrer Anfangsgeschwindigkeiten zeigen. Die Ionen lassen sich daher viel besser in Speicherzellen von Ionsenspeichern

Massenspektrometern einfangen, und sie erhöhen die Genauigkeit der Massenbestimmung in Flugzeit-Massenspektrometern.

Um die aufgetragene Schicht auch gegen nicht-wässrige Lösungsmittel unlöslich zu machen, ist es besonders vorteilhaft, die meist fadenförmigen Moleküle der Lackschicht nach dem Aufbringen auf den Probensträger zumindest an der Oberfläche zu vernetzen. Das kann durch Zugabe eines Brückenbildners geschehen, aber auch durch ionisierende Bestrahlung, zum Beispiel mit UV-Licht. Für die oberflächliche Vernetzung von Zellulose, Nitrat hat sich Diisocyanat als Brückenbildner bewährt, das restliche OH-Gruppen benachbarter Molekülstränge miteinander verbindet. Diese Vernetzung unterbindet die Lösbarkeit in organischen Lösemitteln. Die Vernetzung unterbindet nicht die Zersetzung des Zellulosenitrats unter Einwirkung der Laserstrahlung.

Es hat sich experimentell erwiesen, daß die Konzentration des Ionisierers nicht hoch zu sein braucht. Unersetzte Versuche haben sich allerdings auf Alpha-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (kurz "Alpha-Cyano") beschränkt. Mit etwa 10% Alpha-Cyano in 90% Nitrozellulose erhält man einen nahezu klaren Lack, der sich sehr dünn aufbringen läßt. Er bildet eine gute Grundlage für die Ionisierung von praktisch allen Arten von Proteinen, die auf der Oberfläche aufgebracht werden können.

Es ist jedoch zu erwarten, daß die Suche nach besserer Ionisierung bald Ergebnisse liefern wird, die die Ausbeute an Analytionen, die jetzt etwa bei 1/1000 Ionen pro Analytmolekül liegt, ganz wesentlich erhöhen werden.

Es können in der Lackschicht auch mehrere ionisierende Substanzen gleichzeitig untergebracht werden. Sie können sowohl als eine einzige Lösung mit mehreren Komponenten auf den Probensträger aufgebracht sein, aber auch als schichtartiger Aufbau mit mehreren Lackschichten übereinander, die jeweils nur eine einzige ionisierende Komponente enthalten. Die Lackschichten können sowohl als Einzelkomponenten-Schicht, als Mehrkomponenten-Schicht wie auch als Mehrschichten-Aufbau — können durch eine schützende Deckschicht wasser- und luftdicht abgedeckt sein. Die Deckschicht enthält zweckmäßigerweise keinen Ionisierer. Die Vernetzung kann sich auf die Deckschicht oder sogar nur auf die Oberfläche der Deckschicht beschränken.

Für den MALDI-Prozeß ist es erforderlich, daß die Dampfvolke in einem Gebiet definierten elektrischen Potentials entsteht. Da die Lackschicht nichtleitend ist, hat es sich als günstig erwiesen, einen leitenden Probensträger zu verwenden. Im Falle einer Verwendung von nichtleitenden Probensträgern ist eine oberflächliche Metallisierung angebracht. Diese kann sehr dünn, sogar fast durchsichtig sein, um einen Laserbeschuß von der Rückseite her durch den Probensträger hindurch zu ermöglichen.

Um Aufladungen der Lackschicht zu vermeiden, oder um die Lackschicht selbst leitend zu machen, kann dem Lack auch ein Leiter in disperser Form zugesetzt werden. Dazu kann beispielsweise Kohlenstoff in feinsten, disperser Form verwendet werden.

Durch solcherart leitfähig gemachte Schichten ist es möglich, Probensträgerplatten herzustellen, die direkt als Blotmembran zum Blotting zweidimensional durch Gel-Elektrophorese getrennter Eiweißsubstanzen durch MALDI können. Die 2-dimensionale Abtastung durch MALDI ergibt eine Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber üblichen Färbungsmethoden, die bei mehreren Zehner-





während des Desorptionsvorganges durch die Laserstrahlung in kleinere Moleküle zersetzt wird.

4. Probenträger nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die durch die Laserstrahlung zersetz-  
bare, lackförmige Schutzkomponente ein Spreng-  
stoff oder eine sprengstoffähnliche Substanz mit  
Fähigkeit zur Verpuffung ist.

5. Probenträger nach Anspruch 4, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß Zellulosenitrat als zersetzbare, lack-  
förmige Schutzkomponente verwendet wird.

6. Probenträger nach Anspruch 5, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß Zellulosenitrat mit einem optimalen  
Nitrierungsgrad zwischen 11,5 und 13% Stickstoff  
verwendet wird.

7. Probenträger nach einem der vorhergehenden  
Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die  
Lackschicht nach Aufbringen auf den Probenträger  
zumindest oberflächlich vernetzt und dadurch unlös-  
lich gemacht wird.

8. Probenträger nach Anspruch 7, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß die Vernetzung durch Bestrahlung  
erzeugt wird.

9. Probenträger nach Anspruch 7, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß ein Brückenbildner für die Vernet-  
zung verwendet wird.

10. Probenträger nach Anspruch 9, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß Diisocyanat als Brückenbildner  
verwendet wird.

11. Probenträger nach einem der vorhergehenden  
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß nur eine  
Substanz als Matrixkomponente für die Ionisierung  
der Analysesubstanz vorhanden ist.

12. Probenträger nach einem der vorhergehenden  
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere  
verschiedenartige Substanzen als Matrixkompo-  
nenten für die Ionisierung der Analysesubstanz vor-  
handen sind.

13. Probenträger nach Anspruch 12, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß die Matrixkomponenten in gemein-  
samer Lösung als Lackschicht aufgebracht  
werden.

14. Probenträger nach Anspruch 12, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß die verschiedenen Matrixkompo-  
nenten in verschiedenen Lackschichten übereinan-  
der eingebettet sind.

15. Probenträger nach einem der vorhergehenden  
Ansprüche 2 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß  
die Lackschicht durch eine Deckschicht abgedeckt  
wird, die keine Matrixkomponente für die Ionisie-  
rung der Analysesubstanz enthält.

16. Probenträger nach einem der vorhergehenden  
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine we-  
itere Komponente die Matrix färbt und für das ver-  
wendete Laserlicht absorptiv macht.

17. Probenträger nach einem der vorhergehenden  
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Ma-  
trixschicht durch eine weitere Komponente elek-  
trisch leitfähig gemacht wird.

18. Probenträger nach Anspruch 17, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß feinstdispersierter Kohlenstoff  
als elektrisch leitfähige Komponente verwendet  
wird.

19. Probenträger nach einem der vorhergehenden  
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß er aus  
kleinen magnetischen Kügelchen (magnetic beads)  
besteht.

20. Probenträger nach einem der vorhergehenden  
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Ober-

fläche der Matrixschicht mit Reagenzien belegt ist,  
die die aufzubringenden Analytmoleküle chemisch  
verändern.

21. Probenträger nach Anspruch 20, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß die Reagenzien an die Oberfläche  
kovalent gebunden sind.

22. Probenträger nach einem der vorhergehenden  
Ansprüche 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet,  
daß Enzyme als Reagenzien verwendet werden, die  
aufgebrachte Proteine in charakteristischer Weise  
zerschneiden.

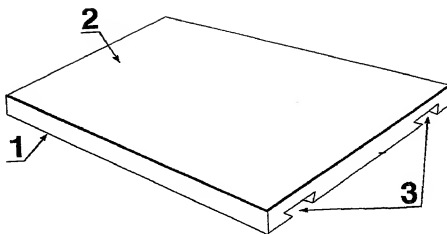
23. Probenträger nach einem der Ansprüche 1 bis  
19, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche mit  
AgENZien belegt ist, die ganz spezifisch bestimmte  
Arten von Analytmolekülen festhalten können.

24. Probenträger nach Anspruch 23, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß Antikörper als AgENZien ver-  
wendet werden.

25. Verfahren zur Herstellung von plattenförmigen  
Probenträgern nach einem der Ansprüche 2 bis 18,  
dadurch gekennzeichnet, daß der in Lösung befind-  
liche Lack durch Sprühen, Drucken oder Streichen  
auf die Probenträgerplatte aufgebracht wird.

26. Verfahren zur Herstellung von plattenförmigen  
Probenträgern nach einem der Ansprüche 2 bis 18,  
dadurch gekennzeichnet, daß der in Lösung befind-  
liche Lack durch Auftropfen auf eine sich schnell  
drehende Trägerplatte aufgebracht wird.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen



Figur 1